



(43) 国际公布日:

2004年6月24日(24.06.2004)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 2004/052383 A1

(51) 国际分类号<sup>7</sup>: A61K 35/78, A61P 9/00, 25/28, 35/00

中国上海市宝山区罗南镇沪太路6950号, Shanghai 201908 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2003/000309

(22) 国际申请日: 2003年4月28日(28.04.2003)

(74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号徐迅, Shanghai 200233 (CN)。

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
02154401.8 2002年12月10日(10.12.2002) CN

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 杭州浙大力夫生物科技有限公司(ZHEJIANG UNIVERSITY (HANGZHOU) LEAF BIO-TECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市凯旋路268号浙大华家池校区食品楼, Zhejiang 310029 (CN)。上海筠腾植物提取科技发展有限公司(SHANGHAI YUNTENG PLANT-EXTRACT SCIENCE AND TECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市宝山区罗南镇沪太路6950号, Shanghai 201908 (CN)。

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(72) 发明人;及

本国际公布:  
— 包括国际检索报告。

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 张英(ZHANG, Ying) [CN/CN]; 吴晓琴(WU, Xiaoqin) [CN/CN]; 俞卓裕(YU, Zhuoyu) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市凯旋路268号浙大华家池校区食品楼, Zhejiang 310029 (CN)。朱云龙(ZHU, Yunlong) [CN/CN]; 陈林根(CHEN, Linggen) [CN/CN]; 罗生根(LUO, Shenggen) [CN/CN];

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: AN COMPOSITION CONTAINING TRITERPENOID SAPONINS EXTRACTED FROM BAMBOO, AND THE PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 从竹子中提取的三萜总皂甙元组合物、制法及用途

(57) Abstract: The present invention relates to a composition containing triterpenoid saponins extracted from Bamboo, and the preparation method and use thereof. The triterpenoid saponins are extracted from various parts of bamboo belonging to Gramineae, such as Bamboo Shavings and the like, using supercritical CO<sub>2</sub> fluid extraction technology. The content of triterpenoid saponins in the composition is 10-90%. The contents of friedelin and lupenone are 5-35% and 1-10% respectively. The extract has good anti-free radical, anti-oxidation, antitumor, hypotensive activities and the like. The extract of the present invention can be useful as therapeutic drugs or functional foods for the treatment or prevention of cardiovascular and cerebral vascular diseases, as well as for the treatment of tumor, and useful in cosmetic field.

(57) 摘要

本发明公开一种从竹子中提取的三萜总皂甙元的组合物及其制法和用途。从禾本科竹子的竹茹等各部位中采用超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取技术提取三萜总皂甙元。提取物中三萜总皂甙元含量为 10~90%; 木栓酮和羽扇豆烯酮含量分别为 5~35% 和 1%~10%。本发明提取物具有优良的抗自由基、抗氧化、抗肿瘤、降血压等生理和药理活性, 可作为防治心脑血管疾病和抗肿瘤的藥物及保健品, 并可用于日用化妆品领域。

## 从竹子中提取的三萜总皂甙元组合物、制法及用途

### 技术领域

本发明涉及一种从竹子中提取的三萜总皂甙元的组合物、方法及其用途。本  
5 发明采用超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取技术从竹子中提取三萜类化合物，这是一组以木栓酮、羽扇豆烯酮及其同系物为主的五环三萜类化合物的混合物，可作为防治心脑血管疾病和抗肿瘤的药物及保健品，并可应用于日用化妆品领域。

### 背景技术

10 竹子属禾本科 (*Gramineae*) 的竹亚科 (*Bambusoideae*)。全世界约有 70 多属、1200 多种，竹林面积约 2000 万 ha。中国是世界上主要的产竹国之一，约有 40 多属 400 余种，占世界竹类种质资源的三分之一，竹林面积 400 万 ha。刚竹属 (*Phyllostachys* Sieb. et Zucc) 全世界有 50 余种，除少数品种外，中国均有出产，其中经济利用价值最高的毛竹林面积约 250 万 ha，占世界毛竹总量的 90% 以  
15 上。

竹子是全世界最具利用价值的天然植物之一。作为森林资源的重要组成部分，不仅以其较高的经济价值，被誉为“穷人的金子”，而且具有广泛的生态环境与社会效益。在竹子有效成分及其生物学效应的研究中，以日本和中国所作的工作为主，印度、巴西、美国和韩国等也做过少量研究。各国所研究的竹类对象具有  
20 显著的地域特征，一般均选用具有本国资源特色的竹子品种。

日本从 20 世纪 70s 起对赤竹属 (*Sasa* Makino et shbata) 的赤竹亚属 (*Subgen. Sasa*) 中华箬竹亚科 (*Subgen. Sasamorpha*) 中的一类草本型竹子[称竹草，(英) Bamboo grass，即 *Sasa albomarginta* Makino & Shibata 等品种]进行了系统的研发，并申报了一系列的国内专利。90s 起，也有少量研究涉及到刚竹属的品种。如 Sakai, Wataru  
25 1980 年申报的专利 [Healthful feed containing bamboo extract, JP Patent 57074049]，描述了用溶剂萃取刚竹属竹子的嫩茎，将提取物加入到家禽、家畜、鱼贝类、宠物和实验动物等的饲料中；同年申报的另一项专利 [Healthful food containing bamboo extract, JP Patent 57039753] 描述了以下内容：刚竹属竹子的嫩秆破碎后，用甲醇、乙醇、氯仿、苯或热水在室温下萃取约 2 周；或被放入容器  
30 中，蒸汽加热至 180°C，蒸馏后冷却，得到了精油和水的混合物，减压浓缩后的产物可加入多种食品中；还申报了对痔疮有治疗作用的竹提取物，主要使用干馏或蒸汽蒸

馏得到提取物,然后用硅胶柱分离得到具有疗痔、降压、放松作用的不同活性部位,其中疗痔部位无论是口服还是外用都具有突出的效应[Production of bamboo extract having effect for hemorrhoids, JP Patent 57038721]。

Kuboyama, N. 等(1981)报道了竹叶提取物及其木质素的抗肿瘤活性[Anti tumor activity of bamboo leaf extracts, *JPN J PHARMACOL*, 1979, 29(SUPPL.):170; Anti tumor activities of bamboo leaf extracts and its lignin, *FOLIA PHARMACOL JPN*, 1981, 77(6):579-596]。Sato, T 等(1986)年报道了一种竹叶提取物溶液用于牙龈的治疗[The use in periodontal therapy of a bamboo leaf extract solution, *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi*, 1986, 28(2):752-757。Kenji, Matsui. 等 1990 年申请的专利,用一种或多种有机溶剂,从斑竹、毛竹、金毛竹等刚竹属的竹子中萃取的有效成分能抑制多种头屑生成菌,防治皮肤老化,并能抑制脂质过氧化和稳定产品 [Skin, scalp and hair agent containing component of suppressing growth of dandruff fungus extracted from bamboo, JP Patent 03251518]。Nishina, A. 等(1991)从毛竹的茎皮中检出了抗菌活性成分 2,6-二甲氧基对苯醌 [*J of Agric & Food Chem*, 1991, 39(2):266-269]。Kiyooka, Takatoshi. (1995)年申报的发明专利“用有机溶剂萃取法从竹皮中制备脱臭剂”[JP Patent 9794290]。Yamanaka, Satoshi 等(1998)报道了竹子干馏液的抗菌活性及其应用[Anti-microbial activity of bamboo dry distillate and its application, *Gekkan Fudo Kemikaru*, 1998, 14(9): 57-60]。Makino, Akimitsu (1998)申报了日本发明专利“竹提取物作为肉类添加剂”[JP Patent 99346719]。Mie University 的 Sakai Koji 等(1999)从笋壳中首次分离出 2 种抗氧化成份:苜蓿素(Tricin)和紫杉叶素(Taxifolin),并用 POV 方法检测其抗氧化活性分别为 $\alpha$ -生育酚的 10%和 1% [Isolation of antioxidative compounds from bamboo shoots sheath, *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, 1999, 46(7): 491-493]。

中国素有“竹子王国”之称,竹子在我国有着悠久的食用历史 [胡春水等, 25 竹的药膳史及竹食品开发,竹子研究汇刊, 1999, 18(1):27-31], 也是我国中医药和保健品开发的重要资源,对国家中药现代化建设具有重要意义。《中国中药资源志要》内 12694 种中药中,竹类共收集 10 属 32 种,记入《中国药典》1990 版的竹类植物近 5 种。不同竹种的竹叶、竹鞭根、竹茹、竹沥、竹实(米)、竹竿、竹膏、竹黄、竹笋、竹砂仁、竹苓、竹衣、竹精、竹鼠、竹蜂等均有不同疗效[张 30 佐玉等,竹子在中医药和保健品开发中的潜力,中药现代化, 2000, 2(3):54~56]。

我国在竹子成分研究及生物利用上做过大量的工作,其中尤以申请者在竹叶

黄酮方面所做的工作较为系统和深入。竹叶提取物(Extract of Bamboo Leaves, Ebl<sub>971</sub>)是申请者近年来从我国资源量最为丰富的刚竹属竹种中开发的一种天然生物黄酮类制剂,以碳苷黄酮为主,其中四种主要的黄酮碳苷分别是荭草苷(Orientin)、异荭草苷(Homoorientin)、牡荆苷(Vitexin)和异牡荆苷(Isovitexin)[张英,天然功能性竹叶提取物——竹叶黄酮,中国食品添加剂,2002,(3):54~58,66]。Ebl<sub>971</sub>具有优良的抗自由基、抗氧化、抗衰老、抗菌、抗病毒及保护心脑血管、防治老年退行性疾病等生物学功效[张英等,竹叶有效成分和抗活性氧自由基效能的研究,竹子研究汇刊,1996,15(3):17-24;张英等,毛金竹叶提取物抗衰老作用的实验研究,竹子研究汇刊1997,16(4):62-67;张英,竹叶提取物类SOD活性的邻苯三酚法测定,食品科学,1997,18(5)47-49;Ying Z. et al, The Bio-antioxidative Activity of Functional Factors in Bamboo Leaves, in: Proceedings of The 3<sup>rd</sup> International Conference of Food Science and Technology, October 19-23, 1997, Davis, U.S.A. Ed. J. R. Whitaker, Food and Nutrition Press, 1998 pp266-273;张英,竹叶提取物类SOD活性的综合考察,中国食品学报1998,2(2):62-66;张英等,黄酮类化合物清除活性氧自由基效能的比较研究,天然产物研究与开发1998,10(4):26-33;张英等,竹叶功能因子生物抗氧化活性的研究,营养学报,1998,20(3):367-371;Chun Hu, Ying Zhang, and David D. Kitts, Evaluation of antioxidant and Prooxidant Activities of Bamboo *Phyllostachys nigra* Var. *Henonis* Leaf Extract in vitro, *J. Agric Food Chem.*, 2000, 48, 3170-3176. ]。Ebl<sub>971</sub>以其丰富的原料来源、明确的功能因子、良好的食用安全性(属实际无毒)、高效稳定的制剂品质(耐水、热、酸解等)和清新甜香的竹子风味,近年来在天然功能性食品添加剂和医药保健品领域崭露头角。2000年和2001年国家专利局分别授权了申请者于1998年申请的2项发明专利[张英,从竹叶中提取黄酮类化合物浸膏或粉剂的生产方法,中国专利 ZL 98 1 04564.2;张英,一种添加竹叶黄酮提取物的保健啤酒,中国专利 ZL 98 1 04563.4]。我国的研究工作基本上都是围绕刚竹属的竹种,尤其是金毛竹、毛竹和桂竹展开的。

印度在竹子方面的工作涉及到竹米营养、竹笋加工、竹纤维制作以及竹叶作为饲料等方面,研究的对象是具有本土资源特色的籼竹属和牡竹属的品种。

巴西位于南美竹区,以籼竹属和牡竹属的丛生竹为主。巴西曾在牡竹属的龙竹(*Dendrocalamus giganteus* Munro)中检出了致癌物质。Ferreira, V. L. P. 等(1992)

报道了用不同的加工方法除去龙竹笋中的致癌物质[Elimination of cyanogenic compounds of bamboo shoots *Dendrocalamus-Giganteus* Munro by different processes, *REV ESP CIENC TECNOL ALIMENTOS*, 1992, 32(2):175-184]。

美国本土上基本无竹子,但随着近年来对竹类产品保健作用的不断认识,也有一些研究机构开始了对竹笋等的研究。Purdue 大学食品和营养系的 Story,J.A.等 1992 在加州 Anaheim 召开的美国实验生物学联邦会议上报告了竹笋降低大鼠血清胆固醇的效应[Bamboo shoots lower serum cholesterol in rats, FASEB (FED AM SOC EXP BIOL) J, 1992, 6(5): A1653]。Rutgers 大学 He YiHui 的博士论文对竹笋在体内外的降胆固醇作用进行了较为系统的研究,认为主要是植物甾醇在起作用[The hypocholesterolemic effect of bamboo shoot in vivo and in vitro (*Phyllostachys edulis*, Phytosterols) 1998]。

纵观世界各国目前在竹子提取物中所做的工作,其提取手段不外乎水提、有机溶剂萃取和蒸汽蒸馏法几种,对有效成分的化学研究以及与生理和药理活性之间构效关系的研究相当欠缺。

本发明所涉及的植物来源可以是竹子的全株(包括茎、根、叶、枝、笋),但主要是指竹子的外表皮(Bamboo bark),所取部位与《中药辞海》(第一卷)[中国医药科技出版社 1993, pp2137~2139]中所载的竹茹基本相同;涵盖的竹种来源及范围也与其相似,并以刚竹属的竹种为主。

《中药辞海》中记载的竹茹[Bamboo Shavings],异名:竹皮(《金匱要略》)、青竹茹(《神农本草经集注》)、淡竹皮茹(《别录》)、淡竹茹(《食疗本草》)、麻巴(《草木便方》)、竹二青(《上海常用中草药》),为禾本科刚竹属、箬竹属和牡竹属中一些竹种的茎秆所刮下的外皮层或其次一层。正品竹茹一般为 2 种:淡竹 *Phyllostachys nigra* var. *henonis* (Bean) Stapf ( *P. henryi* Rendle), 又名甘竹(《广群芳谱》)、白竹(江苏)、毛金竹(浙江);人面竹 *P. aurea* Carr. ex A. & C. Riviere, 又名布袋竹(《台湾植物志》)。另有数种也较广泛地作为竹茹引用:粉绿竹 *P. glauca* McClure, 又名淡竹(江苏);桂竹 *P. makinoi* Hayata; 篌竹 *P. nidularia* Munro, 又名花竹(贵州)、枪刀竹(浙江)、笔笋竹(广东);刚竹 *P. viridis* (Young) McClure; 青秆竹 *Bambusa tuldoidea* Munro; 撑篙竹 *B. pervariabilis* McClure; 粉单竹 *B. chungii* McClure [*Lingnania chungii* (McClure) McClure]; 大头典竹 *Dendrocladopsis beecheyana* (Munro) Keng f. Var. *Pubescens* (P. F. Li) Keng (*Sinocalamus beecheyana* Var. *pubescens* P.

F. Li), 又名大头甜竹(《中国竹类植物志略》); 竹 *Dendrocalamus affinis* Rendle (*Sinicalamus affinis* (Rendle) McClure)。根据所用竹种分布情况来推断, 长江流域以散生竹中的淡竹为主, 次为人面竹、桂竹、篌竹、粉绿竹、刚竹等, 华南与西南地区以丛生竹种中的青秆竹为主, 其次有大头典竹、粉单竹、撑篙竹、慈竹等。

竹茹为临床常用中药之一, 多用于胃热呕吐、胸膈烦闷等症。竹茹的传统炮制方法是除去杂质, 切段或揉成小团经姜汁炒黄后供调配用。始载于(《神农本草经集注》)。历代本草均有记载其功效。如《纲目》谓可治: “伤寒劳复, 小儿热痢, 妇人胎动。”张璐《本经逢原》: “竹茹专清胃腑之热, 为虚烦烦渴, 胃虚呕逆之要药; 咳逆唾血, 产后虚烦, 无不宜之。《金匱》治产后虚烦呕逆有竹皮大丸。《千金方》治产后内虚, 烦热短气, 有甘竹茹汤; 产后虚烦头疼、短气、闷乱不解, 有淡竹茹汤。内虚用甘以安中, 闷乱用淡以清胃, 各有至理存焉。其性虽寒而滑能利窍, 可无郁遏客邪之虑。”贾所学《药品化义》: “竹茹, 轻可去实, 凉能去热, 苦能降下, 专清热痰, 为宁神开郁佳品。主治胃热噎膈, 胃虚干吐, 热呃咳逆, 痰热恶心, 酒伤呕吐, 痰涎酸水, 惊悸怔忡, 心烦躁乱, 睡卧不宁, 此皆胆胃热痰之症, 悉能奏效”。清黄宫绣《本草求真》: “竹茹味甘而淡, 气寒而滑, 凡因邪热客肺, 肺金失养, 而致烦渴不宁, 膈噎呕逆, 恶阻呕吐、吐血、衄血等症者皆当服此”。

《中国药典 2002 版》指明竹茹源自“淡竹、青秆竹和大头典竹”, 性味甘、微寒, 归肺、胃经。功能与主治: 清热化痰, 除烦止呕。用于痰热咳嗽, 胆火挟痰, 烦热呕吐, 惊悸失眠, 中风痰迷, 舌强不语, 胃热呕吐, 妊娠恶阻, 胎动不安。然而, 中医药对竹茹的成分和药理的研究十分贫乏, 导致长期以来竹茹的成分不详、药理不详。仅在《中药辞海》(第一卷)[中国医药科技出版社 1993, pp2138]提及竹茹中含有 cAMP 磷酸二酯酶抑制作用的成分, 为 2,5-二甲氧基-p-苯醌 (2,5-Dimethoxy p-benzoquinone)、p-羟基苯甲醛 (p-Hydroxy benzoaldehyde)、丁香醛(Syringaaldehyde)等。未见有文献提到过竹茹中三萜类化合物的存在。

相反, 在我国民间常用的“中药淡竹叶”[Herba Lophatheri, (英)Common Lophatherum Herb] 的成分描述中提到了三萜类物质。然而, 此处的“淡竹叶”是指禾本科植物淡竹叶 *Lophatherum gracile* Brongn 的茎叶(为多年生草本, 不属于竹亚科), 产于浙江、江苏、湖南、湖北等地。味甘淡, 性寒, 入心、肾两经。具有清热除烦、生津利尿之功效, 可用于热病烦渴, 小便赤涩, 淋浊, 口糜舌疮,

牙龈肿痛。据载：淡竹叶茎叶主要含有三萜化合物和甾类物质：芦竹素 (Arundoin)、印白茅素 (Cylindrin)、蒲公英赛醇 (Taraxerol)、无羁萜 (Friedelin) 及 $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇、蒲公英甾醇等，其地上部分含酚类物质、氨基酸、有机酸和糖类。然而，最近沈阳药科大学的陈泉等人对淡竹叶的成分进行了较为系统的研究 [陈泉等, 中药淡竹叶的化学成分研究, 沈阳药科大学学报, 2002, 19(1):23-24; 和 2002, 19(4):257-258], 前后分离鉴定了 8 个化合物: 3, 5-二甲氧基-4-羟基苯甲醛、反式对羟基桂皮酸、苜蓿素、苜蓿素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、牡荆素、香草醛、胸腺嘧啶和腺嘌呤, 没有提到三萜类物质。

多数三萜 (triterpenoids) 是由 30 个碳原子组成的萜类化合物, 被认为是由 6 个异戊二烯缩合而成的。三萜及其皂甙广泛存在于自然界, 是一类重要的生物活性成分, 根据化学结构可分为三萜皂甙和甾体皂甙两大类。近 30 年来, 随着有机化合物研究手段的不断进步, 很多重要的中草药如人参、三七、绞股蓝、柴胡、黄芪、远志、商陆、桔梗、知母等所含的皂甙得到了系统的研究, 其生物活性和药用价值也逐渐地被认识和日益受到重视。该类物质具有多种生物活性, 如抗菌、抗病毒、抗癌、抗生育、抗炎、降血脂、降血压、降血糖、免疫调节等, 对心血管系统、神经系统、肾上腺皮质系统和酶活性方面都有生理活性, 已成为天然药物研究中的一个重要领域 [姚新生主编, 天然药物化学(第三版), 人民卫生出版社 2001, 257-294; 吴寿金等, 近年来皂甙药理活性的研究概况, 国外医药.植物药分册, 1994, 9(6): 246-252]。

三萜类化合物中五环三萜 (pentacyclic triterperoids) 类型数目较多, 主要的类型为齐墩果烷型、乌苏烷型、羽扇豆烷型和木栓烷型。其中木栓烷 (friedelane) 在生源上是由齐墩果烯羟甲基移位而演变来的。雷公藤 (*Tripterygium wilfordii*) 为卫茅科植物, 在我国作为民间用药有很长历史, 近几年临床应用日趋广泛, 特别是对类风湿疾病有独特疗效, 引起国内外广泛重视, 从中已分离得到多种三萜, 有一类为木栓烷类三萜。如雷公藤酮 (triptergone) 是由雷公藤去皮根中心分离出的三萜化合物, 化学名为 3-hydroxy-25-nor-friedel-3, 1(10)-dien-2-one-30-oic acid, 是失去 25 位甲基的木栓烷型衍生物。从卫茅科植物 *Kokona zeylanica* 已分离鉴定的木栓烷类化合物或其降解产物有 20 余个, Leslie 等从该植物茎皮得到 11 个化合物, 均为木栓烷-3-酮类化合物。

三萜化合物的提取与分离方法大致分为四类: 一是用乙醇或甲醇提取, 提取物直接进行分离; 二是用醇类溶剂提取后, 提取物依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯等溶剂进行分部提取, 然后进一步分离, 三萜成分主要从氯仿部位中获得; 三是制备成衍生

物再作分离，即将提取物先用乙醚萃提取，用重氮甲烷甲基化，制成甲酯衍生物，或将提取物按常法进行乙酰化制成乙酰衍生物，然后进行分离；四是有许多三萜化合物在植物体中是以皂苷形式存在，可在三萜皂苷水解后获得，即将三萜皂苷进行水解，水解产物用氯仿等溶剂萃取，然后进行分离。用化学溶剂提取，不但工艺流程长，溶剂消耗大，操作环境差，更重要的是提取物的产品质量不稳定，容易出现重金属和农残含量偏高，且提取的收率较低。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种从竹子中提取的三萜总皂甙元的组合物、方法及其用途。

在本发明的第一方面，提供了一种从竹子中提取的三萜总皂甙元的组合物，该组合物用香草醛~高氯酸比色法，以木栓酮为标准品，测得其三萜总皂甙元的含量为10~90%，用 GC-MS 联用技术检测其中木栓酮和羽扇豆烯酮的含量分别为 5~35%和 1%~10%。

在一优选例中，所说三萜总皂甙元的含量为 40~80%，木栓酮和羽扇豆烯酮的含量分别为 15~25%和 3~6%。

在另一优选例中，所说三萜总皂甙元是一组以木栓酮、羽扇豆烯酮及其同系物为主的五环三萜类化合物的混合物，外观为黄色或黄绿色的粉末，熔点在 74~79 °C 之间；经溴化钾压片后的红外光谱图显示，该混合物在 2917、2849、1716、1463、1382 和 720 $\text{cm}^{-1}$  处有特征性吸收峰；将三萜总皂甙元溶于光谱纯的二氯甲烷后，在 300~700nm 的波长范围内进行扫描，显示在 412nm 处有强吸收，在 665nm 处有次强吸收，还分别在 505、535 和 605nm 附近有弱吸收。

在本发明的第二方面，提供了一种从竹子中提取三萜总皂甙元的方法，包括步骤：

(a) 以禾本科竹子的竹竿、竹枝、竹叶、笋、笋壳、竹根或其混合物为原料，将所述原料与超临界二氧化碳流体混合进行萃取，从而使竹子中的游离三萜等低极性物质溶解于二氧化碳，其中，萃取温度为 50~65°C，萃取压力为 25~35Mpa；

(b) 改变上述溶解有游离三萜的二氧化碳流体的压力，使二氧化碳气化分离，从而得到析出的三萜总皂甙元，其中分离温度为 35~45°C，分离压力为 5~10Mpa。

在一优选例中，所述的原料是 10~20 目粒度的竹粉末，且在步骤(a)中使用夹带剂，夹带剂的体积用量为  $\text{CO}_2$  量的 5~15%，且二氧化碳气体被循环利用，循环动态



萃取中时间为 2~5 小时。

在另一优选例中，所述的夹带剂选自下组：甲醇、乙醇、丙酮或其混合物。

在另一优选例中，所述的竹子选自下组：刚竹属、籼竹属和牡竹属。

在本发明的第三方面，提供了本发明三萜总皂甙元组合物的以下用途：

5 三萜总皂甙元及其木栓酮单体用于制备降血压、抗心衰、抗心肌缺血、抗脑缺血、抗老年性痴呆和抗肿瘤的新药、中西药复方制剂，以及防治心脑血管疾病和抗肿瘤的保健品、复方制剂。

三萜总皂甙元作为护肤、护发因子用于制备日用化妆品：如护肤品、洗发护发品、沐浴液等。

10 三萜总皂甙元中的五环三萜类化合物用于制备防治心脑血管疾病和抗肿瘤的藥物和保健品、及其日用化妆品。

#### 附图说明

图 1 是 EZR2002 的红外谱图(经溴化钾压片)；

15 图 2 是 EZR2002 的紫外谱图(溶于光谱纯的二氯甲烷)；

图 3 是 EZR2002 的 GC-MS 谱图(同时示木栓酮的质谱棒图)；

图 4 是 EZR2002 的 GC-MS 谱图(同时示羽扇豆烯酮的质谱棒图)；

图 5 是木栓酮标准品的 GC-MS 谱图；

图 6 是羽扇豆烯酮标准品的 GC-MS 谱图。

20

#### 具体实施方式

本发明用超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取技术从禾本科刚竹属、籼竹属和牡竹属的竹子(包括竹竿、竹枝、竹叶、竹笋和竹根箨)中、特别是从刚竹属品种的竹茹中提取三萜类化合物的方法。

25 本发明的一个具体实施方案如下：

将竹粉末(一般控制在 10~20 目的粒度)放入 CO<sub>2</sub> 超临界萃取釜中，在温度为 50~65℃、压力为 25~35 兆帕、使用或不使用夹带剂的状态下，循环动态萃取 2~5h，得到竹提取物(代号为 EZR<sub>2002</sub>)。使用的夹带剂可以是甲醇、乙醇和丙酮等有机溶剂，用量一般为 CO<sub>2</sub> 量的 5~15%(v/v)。

30 本发明的优点是：提供了一组具有多种生理和药理活性的五环三萜类化合物的竹类来源；采用超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取技术实现了竹中三萜总皂甙元的高效提取，

得到了高精度、高质量的产品，并摸清了其主成分及其含量变化范围；同时对竹子三萜总皂甙元及其代表性化合物(木栓酮)的降压作用、抗肿瘤活性及其皮肤生理功效进行了系统的研究，表明其在医药、保健品和日用化妆品领域有着广阔的应用前景。

5

以下的优选例对本发明作详细描述，但并不构成对本发明的限制。

#### 实施例 1A 淡竹提取物的制备

将 5.5kg 粒度为 20 目的刚竹属淡竹(*Phyllostachys nigra* var. *henonis*, 又名毛金竹或金毛竹)的竹茹粉末放入萃取釜内，升温到 55°C，开动 CO<sub>2</sub> 泵，升压到 10 30 兆帕，通过预热器进入萃取釜内；开启夹带剂泵，使 10% 体积比的丙酮通过预热器后同时进入萃取釜，在 55°C 下进行动态萃取 3h。分离釜 1 设定分离压力为 8 兆帕、温度为 45°C，分离釜 2 设定分离压力为 5~6 兆帕、温度为 27~30°C；从分离釜 1 中取出目标产物，经低温干燥、粉碎后，得到 EZR<sub>2002</sub> 121 克，产率约为 2.2%；并从分离釜 2 中回收夹带剂。

15

#### 实施例 1B 毛竹提取物的制备

以刚竹属毛竹(*Phyllostachys pubescens*, 又称楠竹)的笋壳为原料，干燥粉碎后超临界萃取，除萃取温度为 60°C，压力为 25 兆帕，时间为 5h，夹带剂改为 10% 体积比的乙醇外，其余条件与实施例 1A 相同，EZR<sub>2002</sub> 的产率约为 0.98%。

20

#### 实施例 1C 青皮竹提取物的制备

取箬竹属青皮竹(*Bambusa textiles* MuClure, 又名篾竹、山青竹)的全株，干燥粉碎后超临界提取。萃取温度为 50°C，压力为 30 兆帕，时间为 4h；不使用夹带剂；分离釜设定分离压力为 6 兆帕、温度为 40°C，从中取出目标产物，经低温干燥、粉碎后，得到 EZR<sub>2002</sub>，产率约为 1.1%。

25

#### 实施例 2 竹提取物的表征

本实施例提供了实施例 1A-1C 用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取手段得到的竹提取物(统称为 EZR<sub>2002</sub>)的产品特征。(实施例 1A-1C 的提取物特征相同)

30 EZR<sub>2002</sub> 是一组以木栓酮、羽扇豆烯酮及其同系物为主的五环三萜类化合物的混合物，外观为黄色或黄绿色的粉末，熔点在 74~79°C 之间。经溴化钾压片后的

红外光谱图显示, 该混合物在 2917、2849、1716、1463、1382 和  $720\text{cm}^{-1}$  处有特征性吸收峰 (见附图 1)。将 EZR<sub>2002</sub> 溶于光谱纯的二氯甲烷后, 在 300~700nm 的波长范围内进行扫描, 显示在 412nm 处有强吸收, 在 665nm 处有次强吸收, 还分别在 505、535 和 605nm 附近有弱吸收 (见附图 2)。

5 用香草醛~高氯酸比色法, 以木栓酮为标准品, 测得 EZR<sub>2002</sub> 不同批次间三萜总皂甙元的含量在 55~75% 之间。经 GC-MS 联用技术的分析和检测, 显示其中主要的游离三萜是木栓酮(friedelin)、木栓醇(friedelan-3- $\beta$ -ol)、羽扇豆烯酮(lupenone)和羽扇豆醇(lupeol)等五环三萜类的化合物。其中 MS-GS 联用分析的实验条件如下:

10 仪器: Agilent 公司的 GC 6890~MS 5973;

GC 条件:

检测器: FID, 280°C;

柱: HP5 毛细管柱;

载气: N<sub>2</sub>;

15 H<sub>2</sub> 流速 30ml/min;

空气流速 200ml/min;

尾冲气流 50ml/min;

程序升温: 在 100°C 下保持 2min 后, 以 20°C/min 的速率上升到 270°C, 保持 50min。

20 进样: 不分流进样, 进样量 1 $\mu$ l, 温度 280°C。

MS 的条件:

柱: HP5-MS 毛细管柱;

载气: 氦气;

柱流速: 1ml/min;

25 程序升温: 在 100°C 下保持 3min 后, 以 20°C/min 的速率上升到 270°C, 保持 50min。

检测方式: 扫描质量范围 18-500m/z, 倍增管电压 1600ev; 数据库为 NIST98。

30 经与从法国 EXTRASYNTHESE 公司购买的木栓酮和羽扇豆烯酮标准品 (HPLC 纯) 的 GC-MS 联用技术的对照分析和定量检测, EZR<sub>2002</sub> 不同批次间木栓酮的含量平均为  $(20.2 \pm 5.2)\%$ , 羽扇豆烯酮的含量平均为  $(5.2 \pm 1.5)\%$ 。EZR<sub>2002</sub> 样品及其木栓酮

和羽扇豆烯酮标准品的 GC-MS 谱图见附图 3~附图 6。

本发明还同时包括了竹提取物(代号为 EZR<sub>2002</sub>)作为防治心脑血管疾病、抗肿瘤的  
5 药物和保健品, 及其作为护肤因子在日用化妆品中的用途。实施例 3-6 证实了本发明提取物的各种生理和药理活性。

### 实施例 3 EZR<sub>2002</sub> 的抗自由基活性

采用 Vc-Cu<sup>++</sup>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-酵母多糖的羟自由基( $\cdot$ OH)产生体系, 用化学发光法测定  
10 [张英等, 竹叶有效成分和抗活性氧自由基效能的研究, 竹子研究汇刊, 1996, 15(3): 17-24], 测得 EZR<sub>2002</sub> 对羟自由基的 IC<sub>50</sub> 为 (39.6±10.5) μg/ml; 用比色法测得 EZR<sub>2002</sub> 对 DPPH 自由基的 EC<sub>50</sub> 为 (300.4±50.6 μg/ml); 显示了相当强的清除活性氧自由基的能力, 具有作为生物抗氧化剂应用的潜力。

### 实施例 4 EZR<sub>2002</sub> 对自发性高血压大鼠的降压作用

#### 15 4.1 试验原材料

EZR<sub>2002</sub> 用吐温-80 助溶, 分别加蒸馏水配制成 20 和 60mg/ml 的溶液, 临用时新鲜配制; 对照组给予 20%吐温-80, 体积为 0.5ml/100g 体重。

自发性高血压大鼠(SHR): 18 周龄, 雄性, 体重在 300~365 克, 由中科院上海实验动物中心提供, 动物合格证号: 沪动合证字 152 号。

#### 20 4.2 实验方法

清醒大鼠血压测定采用 SHR 大鼠电子血压仪(北京中日友好医院生产)进行尾动脉间接测压法, 将大鼠置于 38°C 温箱内加热 15~20min, 同时测定收缩压和心率。

自发性高血压大鼠 18 只, 随机分为三组: 对照组给予吐温, EZR<sub>2002</sub> 分设  
25 100mg/kg/d 和 300mg/kg/d 二个剂量, 每组 6 只。大鼠在给药前一周开始测压, 待血压稳定后开始实验, 每天给药一次, 连续一周, 并分别在给药后的第 1、4 和 7 天测定大鼠血压。在首次给药时, 先测定大鼠给药前血压, 然后灌胃给药, 并分别测定 2、4、6h 药物对大鼠的降压作用。结果显示 EZR<sub>2002</sub> 的降压作用在 4~6h 到达峰值。在第 4 和第 7 天实验中, 测压的时间定在给药前(即前次给药后 24h)  
30 和给药后 4h 进行。

#### 4.3 试验结果

EZR<sub>2002</sub>100mg/kg/d 给药组,实验第一天给药前大鼠的收缩压为  $195 \pm 8$  mmHg, 给药后 2h 下降至  $179 \pm 14$  mmHg, 给药后 4h 和 6h 分别为  $169 \pm 18$  和  $165 \pm 19$  mmHg, 均较给药前明显下降 ( $p < 0.05$  和  $p < 0.01$ )。EZR<sub>2002</sub>300mg/kg/d 给药组, 给药前大鼠的收缩压为  $199 \pm 7$  mmHg, 给药后 2h 下降至  $188 \pm 12$  mmHg, 给药后 4h 和 6h 分别为  $181 \pm 14$  和  $179 \pm 6$  mmHg, 均较给药前明显下降 ( $p < 0.05$  和  $p < 0.01$ ), 见表 1。

表 1 EZR<sub>2002</sub> 不同剂量灌胃给药对自发性高血压大鼠血压的影响 (n=6)

组别	给药前	给药后时间 (h)		
		2	4	6
对照组	$191 \pm 15$	$189 \pm 13$	$193 \pm 12$	$180 \pm 11$
100mg/kg/d	$195 \pm 8$	$179 \pm 14^*$	$169 \pm 18^{**}$	$165 \pm 19^{**}$
300mg/kg/d	$199 \pm 7$	$188 \pm 12$	$181 \pm 14^*$	$179 \pm 6^{**}$

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , 与给药前比较。

EZR<sub>2002</sub>300mg/kg/d 给药组大鼠,测定第四天给药前的血压(相当于前一天给药后 24 小时)分别为  $193 \pm 8$  和  $189 \pm 20$  mmHg, 与对照组大鼠的血压( $190 \pm 18$  mmHg)无明显差别。同样, 测定两组大鼠第七天给药前的血压(相当于前一天给药后 24 小时)分别为  $184 \pm 13$  和  $187 \pm 18$  mmHg, 与对照组大鼠的血压( $187 \pm 20$  mmHg)亦无明显差别。表明 EZR<sub>2002</sub> 的降压作用维持时间小于 24 小时。见表 2。

表 2 EZR<sub>2002</sub> 对自发性高血压大鼠血压的影响 (n=6)

组别	第一天给药前	第四天给药前	第七天给药前
对照组	$191 \pm 15$	$190 \pm 18$	$187 \pm 20$
100mg/kg/d	$195 \pm 8$	$193 \pm 8$	$184 \pm 13$
300mg/kg/d	$199 \pm 7$	$189 \pm 20$	$187 \pm 18$

EZR<sub>2002</sub>100 和 300mg/kg/d 剂量组的大鼠在给药的 7 天中, 观察第一天、第四天、第七天的大鼠血压, 均显示有明显的降压作用, 见表 3。给药期间同时观察大鼠心率, 结果显示 EZR<sub>2002</sub> 对大鼠的心率没有明显的影响, 见表 4。而对照组大鼠在实验期间血压无明显变化, 见表 1、表 2 和表 3。

表 3 EZR<sub>2002</sub> 不同剂量灌胃给药对自发性高血压大鼠血压的影响 (n=6)

组 别	给药前	给药后天数		
		1d	4d	7d
对照组	191±15	193±12	180±19	185±25
100mg/kg/d	195±8	169±18**	165±14**	162±9**
300mg/kg/d	199±7	181±14*	176±19*	178±14*

\*p<0.05, \*\*p<0.01, 与给药前比较; 给药后 4h 测定。

表 4 EZR<sub>2002</sub> 不同剂量灌胃给药对自发性高血压大鼠心率的影响\* (n=6)

组 别	给药前	给药后天数		
		1d	4d	7d
对照组	374±77	391±50	402±55	424±54
100mg/kg/d	355±42	332±38	353±69	399±65
300mg/kg/d	357±48	344±30	395±67	446±37

\*给药后 4 小时测定。

4.4 结论 竹提取物 (EZR<sub>2002</sub>) 对自发性高血压大鼠具有明显的降压作用。

## 实施例 5 EZR<sub>2002</sub> 及其分离组分的抗肿瘤活性

### 5.1 ZR<sub>2002</sub> 的抗肿瘤活性体外筛选

5.1.1 筛选方法 磺酰罗丹 B (sulforhodamine B, SRB) 蛋白染色法  
四氮唑盐 (microculture tetrazolium, MTT) 还原法

5.1.2 细胞株 P<sub>388</sub> 小鼠白血病; A<sub>549</sub> 人肺腺癌。

5.1.3 作用时间 48h 和 72h

5.1.4 活性评定指标

无效:  $10^{-5}\text{mol/L} < 85\%$

弱效:  $10^{-5}\text{mol/L} \geq 85\%$  或  $10^{-6}\text{mol/L} > 50\%$

强效:  $10^{-6}\text{mol/L} \geq 85\%$  或  $10^{-7}\text{mol/L} > 50\%$

表 5 ZER<sub>2002</sub> 对肿瘤细胞 (P<sub>388</sub> 小鼠白血病) 生长的抑制作用\*

试样浓度	抑制率 (%)					活性评价
长春新碱 (mol/L)	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	强 效
	93.1	94.3	94.8	94.7	93.2	
EZR <sub>2002</sub> (mg/mL)	1	0.25	0.063	0.016	0.004	有活性
	90.7	98.2	90.4	57.7	0	

\* MTT 还原法; 作用时间 48h。

表 6 ZER<sub>2002</sub> 对肿瘤细胞 (A<sub>549</sub> 人肺腺癌) 生长的抑制作用\*

试样浓度	抑制率 (%)					活性评价
长春新碱 (mol/L)	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	弱 效
	71.3	71.6	66.5	44.3	9.6	
EZR <sub>2002</sub> (mg/mL)	1	0.25	0.063	0.016	0.004	有活性
	70.2	90.6	24.8	0	0	

\*SRB 蛋白染色法; 作用时间 72h。

5 5.1.5 实验结果: 见表 5 和表 6。

5.1.6 结论: EZR<sub>2002</sub> 对 P<sub>388</sub> 小鼠白血病和 A<sub>549</sub> 人肺腺癌细胞株均显示有抑制作用, 具有抗癌活性。5.2 从 EZR<sub>2002</sub> 中分离得到的木栓酮的体外抗癌作用

10 为了进一步评价 EZR<sub>2002</sub> 的抗肿瘤能力, 申请者又采用硅胶柱层析和逆流色谱制备技术, 从中分离得到了木栓酮单体组分, 经 GC-MS 分析确认其纯度为 90.5%。委托沈阳药科大学的国家沈阳新药安全评价研究重点实验室采用 MTT 方法, 对木栓酮单体试样的体外抗癌活性进行了测定。

## 5.2.1 细胞株

15 本次实验选用 A<sub>375</sub> (人黑色素瘤)、L<sub>929</sub> (小鼠肺上皮癌)、Hela (人宫颈癌)、THP-1 (人巨噬组织瘤) 四种细胞株用作活性筛选。其中前三种为贴壁细胞, 第四种为悬浮细胞。

## 5.2.2 实验材料及培养条件

20 所用细胞均培养于 RPMI-1640 培养液中, 培养液中含有 10% 胎牛血清、100U/mL 青霉素、100μg/mL 链霉素、0.2%NaHCO<sub>3</sub>。各成分均用去离子三蒸水配制, 溶解后用 0.22μm 滤膜过滤除菌, 胎牛血清使用前 56°C、30min 灭活。细胞在上述培养液中于 37°C、5%CO<sub>2</sub> 浓度的培养箱中培养。

### 5.2.3 方法和结果

取对数生长期的  $A_{375}$ 、 $L_{929}$ 、Hela 细胞，将细胞密度调至  $5 \times 10^4$  个/mL，由于 THP-1 较小，其密度调至  $1 \times 10^5$  个/mL，接种于 96 孔版内 ( $100 \mu\text{l}/\text{well}$ )。悬浮细胞培养 4h 后加试样，贴壁细胞培养 12h 后加试样。木栓酮试样事先溶于 DMSO，  
5 超声波助溶，再溶于培养液中 (DMSO 不超过 0.1%)，取 7.5、15、30、60、120、240、480 和  $960 \mu\text{mol}/\text{L}$  八个试样浓度，每个浓度设四个平行孔，同时设阴性对照。细胞加样后继续培养 24h 和 48h 后，向细胞液中加入 MTT 溶液 (浓度为  $5 \text{mg}/\text{mL}$ )  $15 \mu\text{l}/\text{well}$ 。培养 48h 后，1500rpm 离心 5min，吸弃上清，向细胞中加入 DMSO ( $150 \mu\text{l}/\text{well}$ )，微量震荡器震荡 10min，将结晶完全溶解，酶标仪在 492nm 处测  
10 定吸光度 (OD 值)。计算药物对细胞增殖的抑制率，并采用 Bliss 法计算木栓酮的半抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )，结果见表 7。

### 5.2.4 与阳性对照物的比较

本实验采用去甲斑蝥素作为阳性对照，表 8 为  $120 \mu\text{mol}/\text{L}$  的去甲斑蝥素 24h  
< 和 48h 时对  $A_{375}$  细胞、 $L_{929}$  细胞和 Hela 细胞的抑制率，并列出了相对应的木栓酮  
15 的数据。

表 7 从  $\text{EZR}_{2002}$  中分离得到的木栓酮试样对四种癌细胞的抑制率和  $\text{IC}_{50}$

试样浓度 ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	抑制率 (%)							
	$A_{375}$ 细胞		$L_{929}$ 细胞		Hela 细胞		THP-1 细胞	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
7.5	0	0.51	5.42	17.29	34.96	19.99	4.89	8.6
15	6.43	6.29	10.36	21.64	34.69	17.18	0	0
30	0.43	17.18	13.15	38.84	33.30	24.6	3.04	7.57
60	14.12	44.44	22.74	66.82	43.45	41.38	45.25	52.61
120	36.70	88.59	37.57	81.13	71.59	85.96	58.8	77.35
240	44.82	100.28	52.26	99.45	88.19	99.53	68.52	95.02
480	63.27	96.13	48.13	98.17	88.10	97.99	74.09	92.93
960	60.36	89.78	38.87	89.86	73.80	91.98	70.83	82.46
$\text{IC}_{50}$	356.54	61.52	665.42	36.94	61.25	64.69	85.10	58.04



表 8 去甲斑蝥素和木栓酮对三种贴壁肿瘤细胞抑制率(%)的比较

受试物*	A <sub>375</sub> 细胞		L <sub>929</sub> 细胞		Hela 细胞	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
去甲斑蝥素	38.6	50.4	40.5	34.4	34.1	43.7
木栓酮	36.7	88.6	37.6	81.1	71.6	86.0

\*两种受试物的浓度均为 120 $\mu$ mol/L。

### 5.2.5 结论

从 EZR<sub>2002</sub> 中分离得到的木栓酮单体组分对 A<sub>375</sub> (人黑色素瘤)、L<sub>929</sub> (小鼠肺上皮癌)、Hela (人宫颈癌)、THP-1 (人巨噬组织瘤) 四种癌细胞的增殖均有不同程度的抑制作用, 且其抑制率具有时间和剂量的依赖性。

木栓酮试样在 24h 时即对 Hela 细胞和 THP-1 细胞体现出较为明显的作用, 说明木栓酮对上述细胞的敏感性较高, 而对 A<sub>375</sub> 细胞和 L<sub>929</sub> 细胞的敏感性稍差。

与阳性药物 (去甲斑蝥素) 的抑制效果比较, 表明木栓酮具有相当强的抗癌活性, 可以作为抗癌药物和保健品加以开发, 同时也证明了木栓酮是 EZR<sub>2002</sub> 中存在的主要抗癌活性成分。

## 实施例 6 EZR<sub>2002</sub> 的皮肤生理活性

为了评价 EZR<sub>2002</sub> 在日用化妆品领域的应用前景, 申请者又委托复旦大学公共卫生学院皮肤生理毒理研究室对 EZR<sub>2002</sub> 的皮肤生理功效进行了测试。

### 6.1 实验材料与方法

6.1.1 受试物 EZR<sub>2002</sub> 用 DMSO 溶解, 经 0.22 $\mu$ m 滤膜抽滤除菌, 以无血清 DMEM 稀释为受试浓度, 终浓度为 0.5%、0.05%、0.005% 和 0.0005%。-4 $^{\circ}$ C 保存。以无血清 DMEM 作为对照。

6.1.2 试剂器皿 K-SFM 培养基 (Gibcol 公司, USA)、DMEM 培养基、胰岛素、小牛血清 (NBS)、氢化可的松、青霉素、链霉素、胰蛋白酶、Ficoll、96 孔板及 24 孔板、及 35mm 培养皿和 25cm<sup>2</sup> 培养瓶 (Corning 公司, USA)。

6.1.3 仪器 酶标仪 (BIO-TEK 公司)、pH 计、超净台、培养箱、722 分光光度计。

6.1.4 皮肤细胞原代培养 取出生三天的 SD 大鼠背部皮肤, 采用 0.25% 胰酶冷消化法制备皮肤表皮角元细胞, 以 K-SFM 培养基; 细胞密度调整至 1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml, 接种于 96 孔板、24 孔板。24h 换第一次液, 然后每 2~3 天换液。当上述培养细胞

生长至 80%融合时, 加入受试物。

6.1.5 脂质过氧化产物(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)测定 MDA 测定采用 TBA 比色法, SOD 测定采用亚硝酸盐还原法, 试剂盒由南京建成生物公司提供。

6.1.6 安全性评价测试 根据 1999 年国家卫生部颁布的《化妆品卫生规范》中的评价程序和方法进行。受试物浓度为 10%。皮肤刺激试验: 取受试物 0.2ml 涂于皮肤上每天一次, 每次 1h, 连续 14 天; 眼刺激试验: 将受试物 0.1ml 滴入结膜囊中, 于染毒后 1、24、48、72h 以及第 4 天、第 7 天对动物眼睛进行检查。

## 6.2 结果

6.2.1 延缓皮肤衰老的作用 EZR<sub>2002</sub> 在 0.0005%~0.005%剂量(即 5~50mg/kg)范围内使皮肤细胞的 MDA 非常显著地低于对照组, SOD 活性明显高于对照组, 见表 9。

表 9 EZR<sub>2002</sub> 对皮肤角质形成细胞 MDA 生成与 SOD 活性的影响

试样浓度(%)	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)
空白对照	1.66±0.22	2.94±0.085
0.0005	0.60±0.21**	3.21±0.081*
0.005	0.58±0.33**	3.36±0.024*
0.05	2.66±0.42	2.43±0.115
0.5	4.60±0.67	0.93±0.47

注: \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , 与对照相比。

6.2.2 安全性 皮肤刺激试验及眼刺激试验结果均为阴性, 显示无皮肤及眼刺激性。

## 6.3 结论

EZR<sub>2002</sub> 在 5~50mg/kg 的剂量下具有较强的抗氧化损伤作用, 能够增强皮肤 SOD 的活性, 减少氧化产物 MDA 的生成, 具有在护肤、护发等日用化妆品中应用的良好生理学功效。

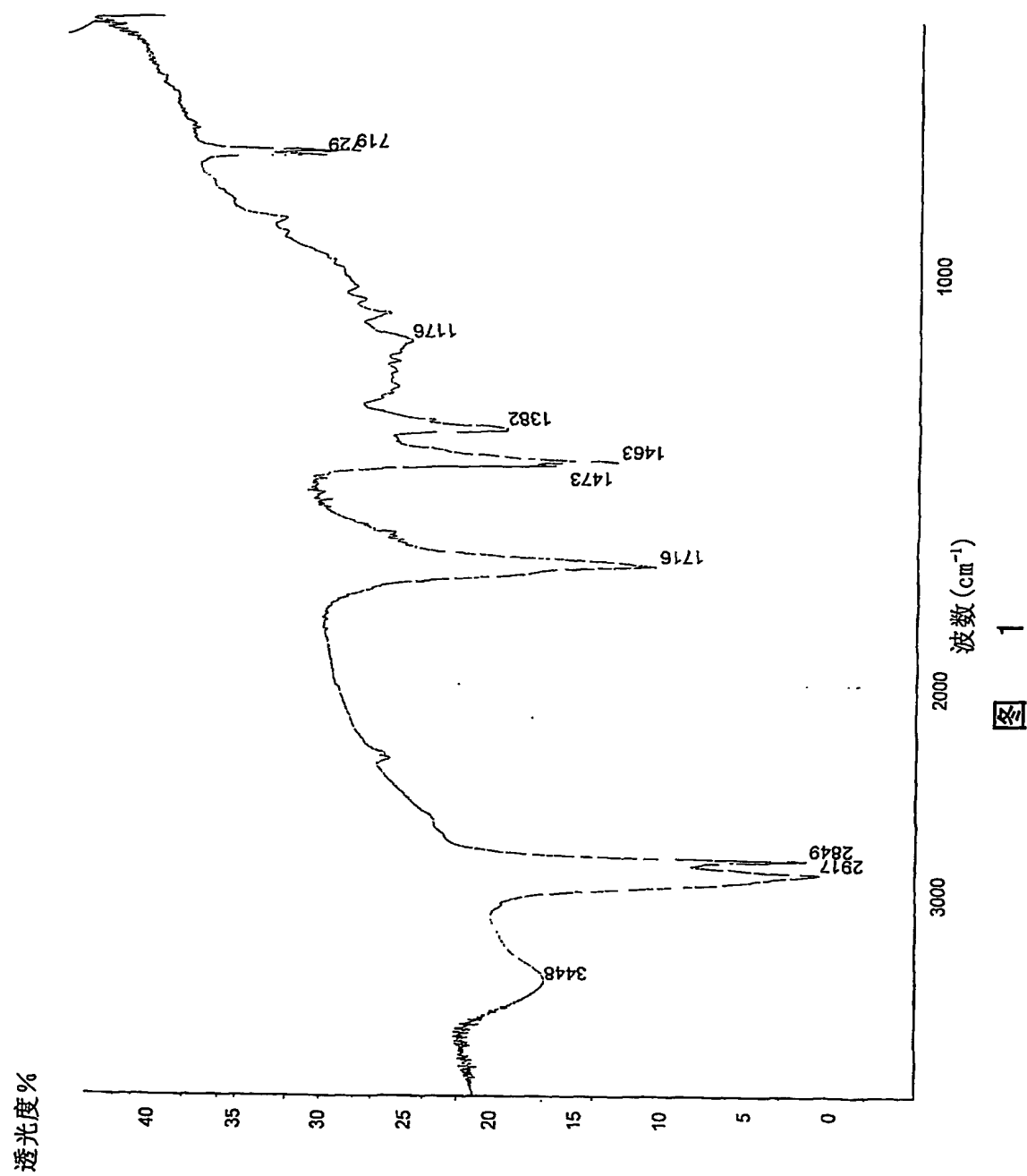
在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

## 权 利 要 求

1. 一种从竹子中提取的三萜总皂甙元的组合物, 其特征在于, 用香草醛~高氯酸比色法, 以木栓酮为标准品, 测得三萜总皂甙元的含量为 10~90%, 用 GC-MS 联用技术检测其中木栓酮和羽扇豆烯酮的含量分别为 5~35%和 1%~10%。
2. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所说三萜总皂甙元的含量为 40~80%, 木栓酮和羽扇豆烯酮的含量分别为 15~25%和 3~6%。
3. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于所说三萜总皂甙元是一组以木栓酮、羽扇豆烯酮及其同系物为主的五环三萜类化合物的混合物, 外观为黄色或黄绿色的粉末, 熔点在 74~79°C 之间; 经溴化钾压片后的红外光谱图显示, 该混合物在 2917、2849、1716、1463、1382 和 720cm<sup>-1</sup> 处有特征性吸收峰; 将三萜总皂甙元溶于光谱纯的二氯甲烷后, 在 300~700nm 的波长范围内进行扫描, 显示在 412nm 处有强吸收, 在 665nm 处有次强吸收, 还分别在 505、535 和 605nm 附近有弱吸收。
4. 一种从竹子中提取三萜总皂甙元的方法, 其特征在于, 包括步骤:
  - (a) 以禾本科竹子的竹竿、竹枝、竹叶、笋、笋壳、竹根或其混合物为原料, 将所述原料与超临界二氧化碳流体混合进行萃取, 从而使竹子中的游离三萜等低极性物质溶解于二氧化碳, 其中, 萃取温度为 50~65°C, 萃取压力为 25~35Mpa;
  - (b) 改变上述溶解有游离三萜的二氧化碳流体的压力, 使二氧化碳气化分离, 从而得到析出的三萜总皂甙元, 其中分离温度为 35~45°C, 分离压力为 5~10Mpa。
5. 根据权利要求 4 所述的方法, 其特征在于, 所述的原料是 10~20 目粒度的竹粉末, 且在步骤 (a) 中使用夹带剂, 夹带剂的体积用量为 CO<sub>2</sub> 量的 5~15%, 且二氧化碳气体被循环利用, 循环动态萃取中时间为 2~5 小时。
6. 根据权利要求 4 所述的方法, 其特征在于, 所述的夹带剂选自下组: 甲醇、乙醇、丙酮或其混合物。
7. 如权利要求 4 所述的方法, 其特征在于, 所述的竹子选自下组: 刚竹属、籼竹属和牡竹属。
8. 如权利要求 1 所述的三萜总皂甙元组合物的用途, 其特征在于, 用于制备降血压、抗心衰、抗心肌缺血、抗脑缺血、抗老年性痴呆和抗肿瘤的新药、中药复方制剂, 或防治心脑血管疾病和抗肿瘤的保健品、复方制剂。
9. 如权利要求 1 所述的三萜总皂甙元组合物的用途, 其特征在于, 作为护肤、

护发因子用于制备日用化妆品。

10. 一种从竹子中提取的三萜总皂甙元的用途，其特征在于，三萜总皂甙元中的五环三萜类化合物用于制备防治心脑血管疾病和抗肿瘤的药物和保健品，及日用化妆品。



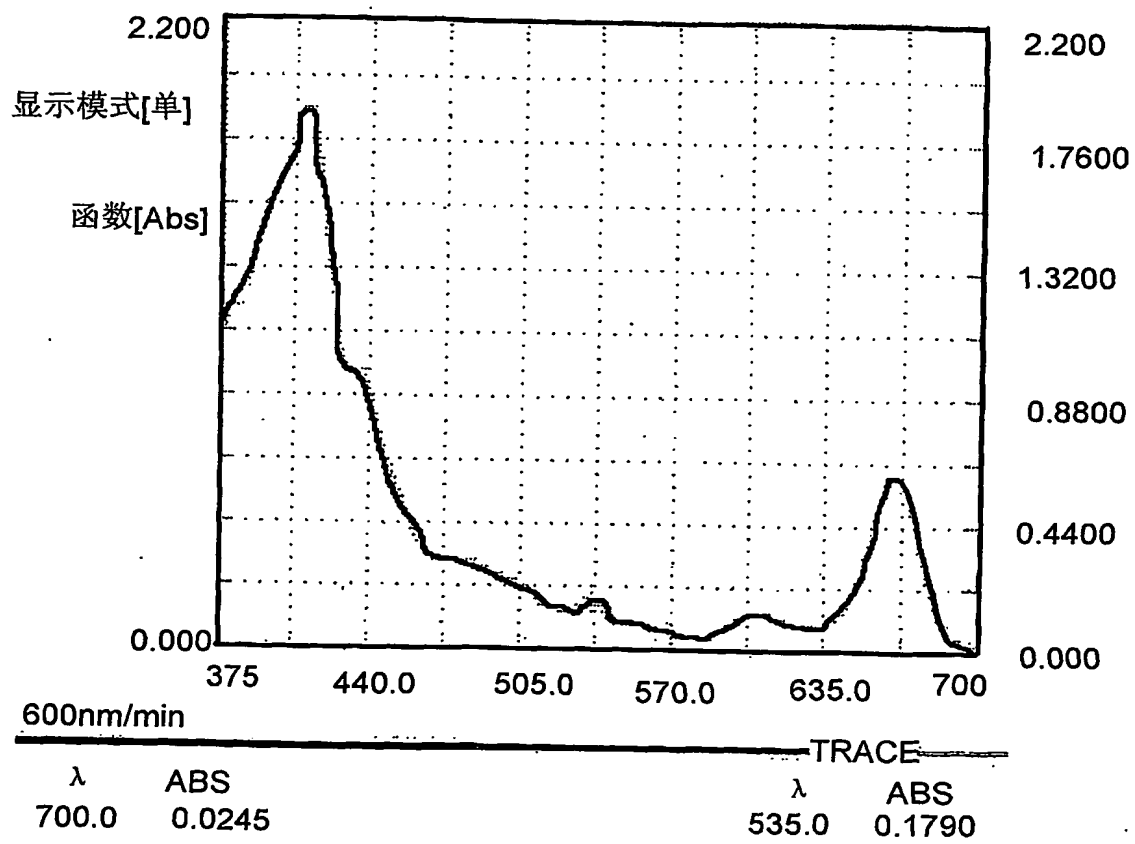


图 2

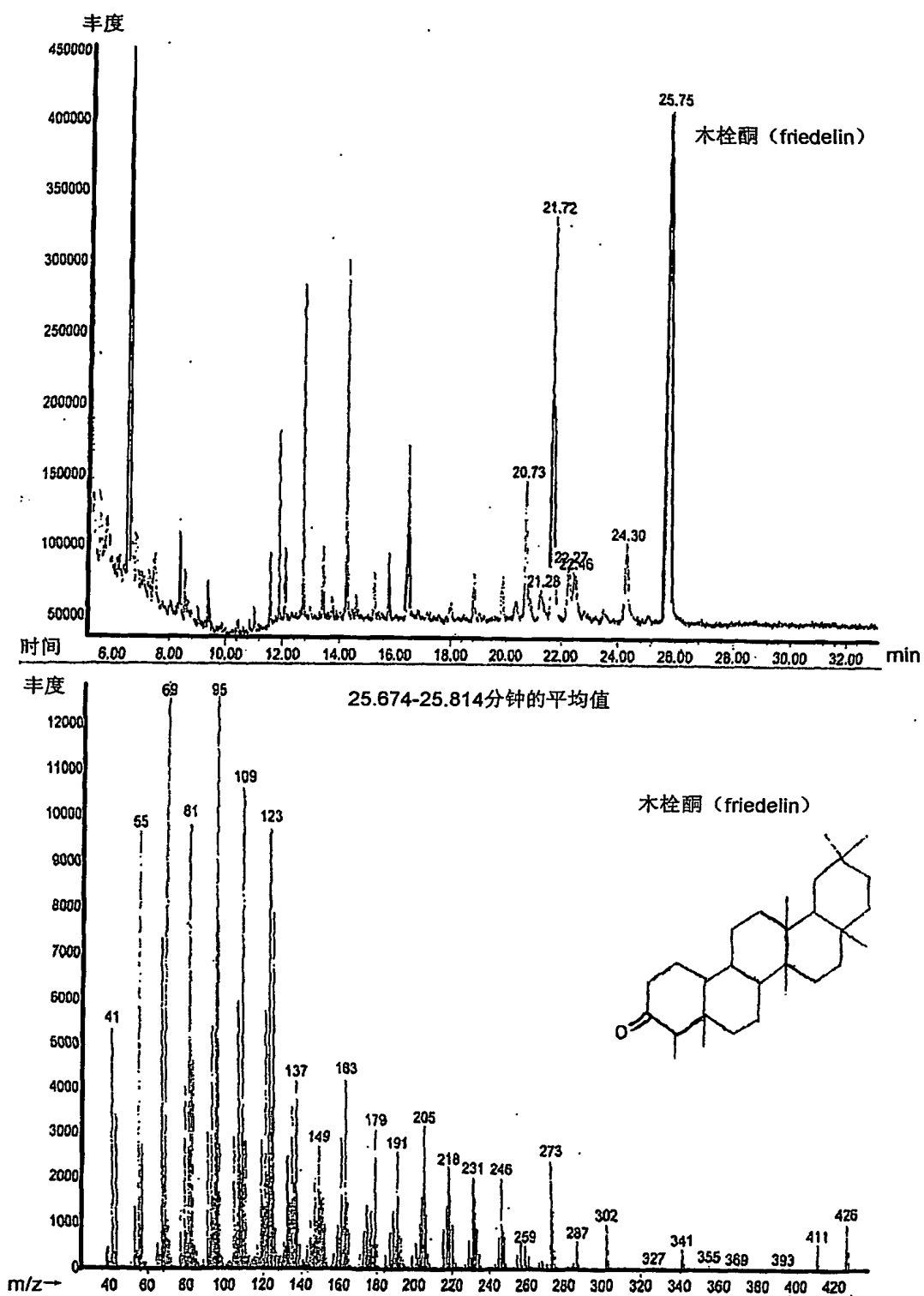


图 3

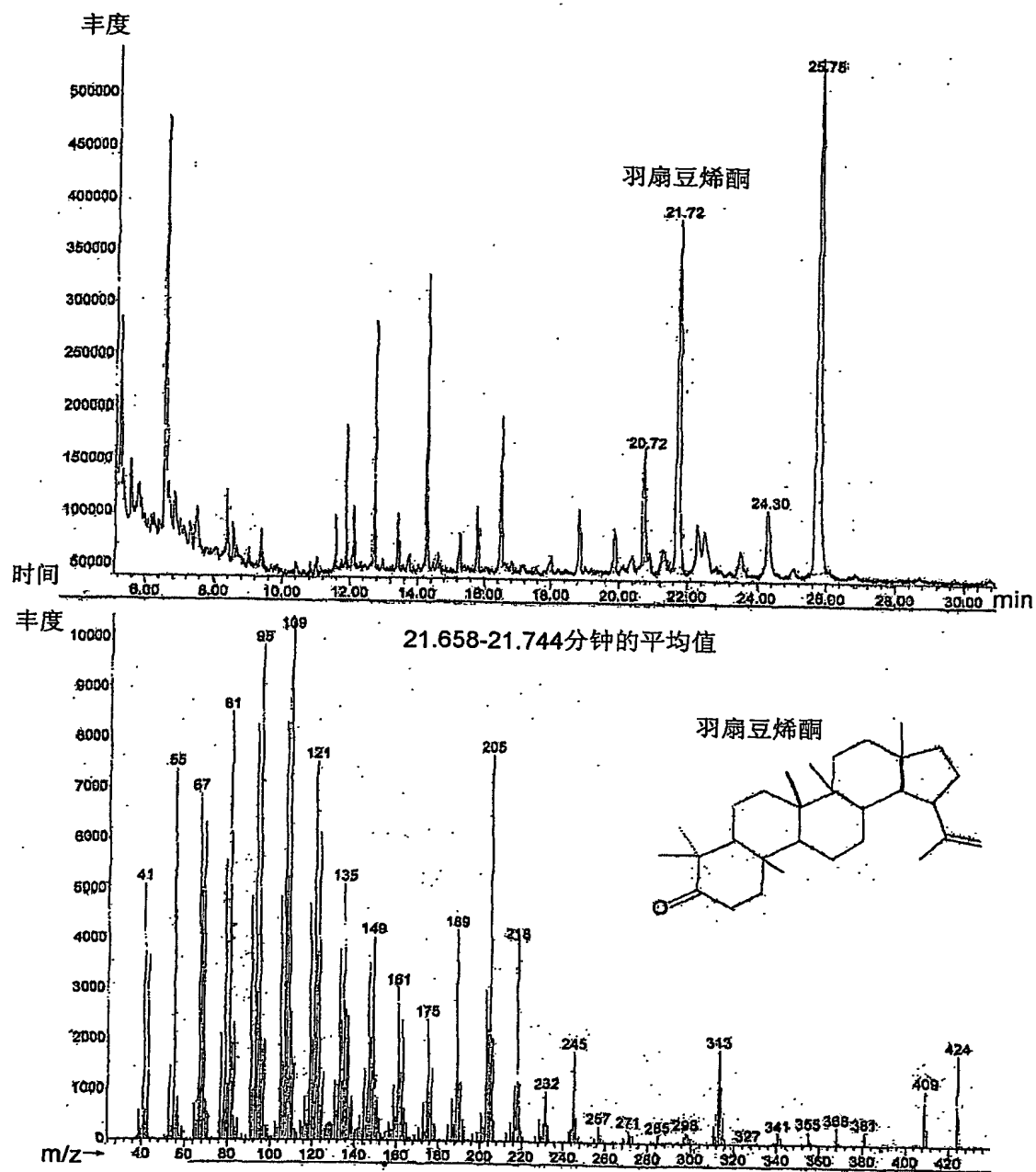


图 4



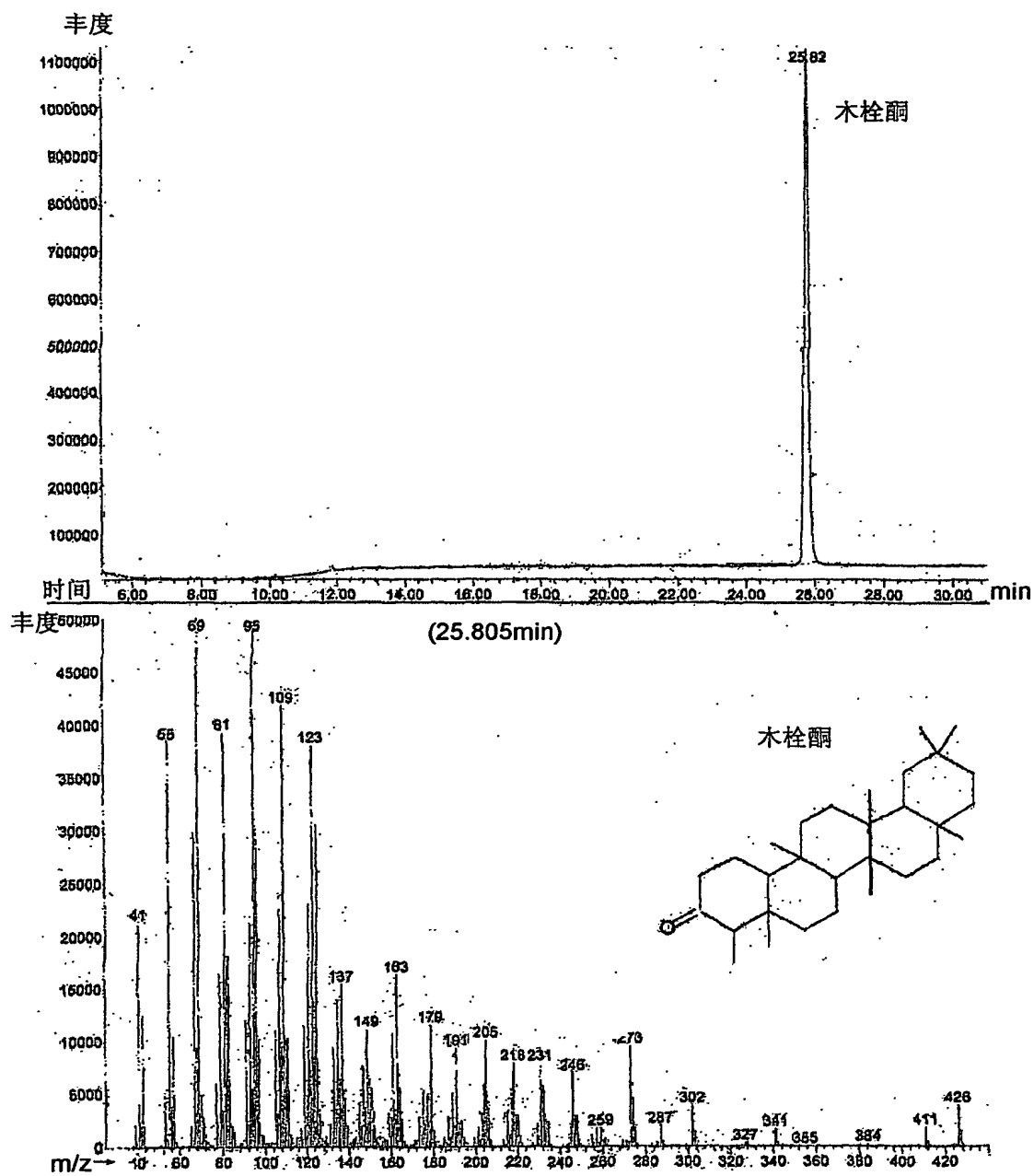


图 5

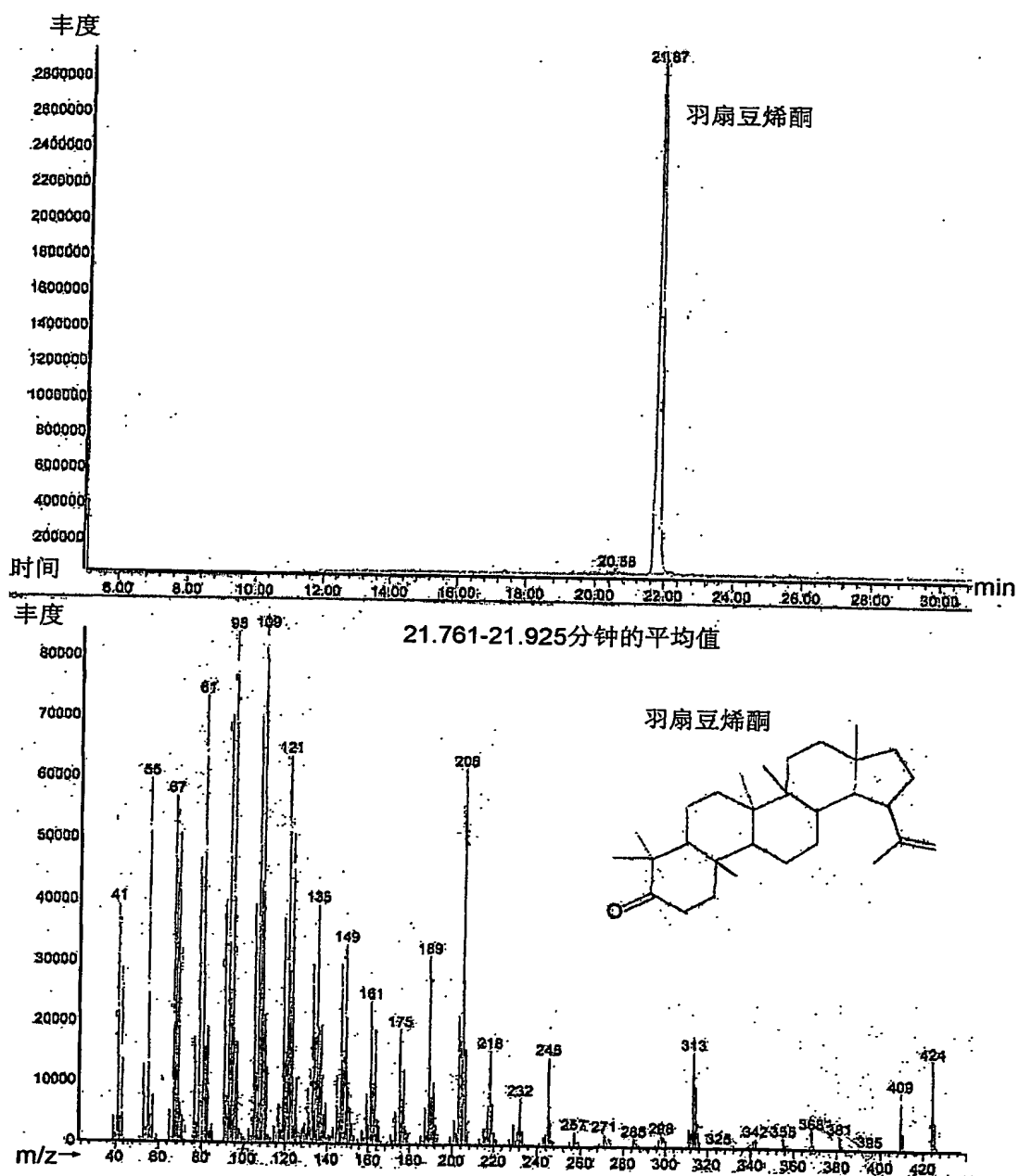


图 6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN 03/00309

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

PCT(7):A61K35/78, A61P9/00, 25/28, 35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

PCT(7):A61K35/78, A61P9/00, 25/28, 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Chinese Patent Documentation, Chinese Pharmaceutical Abstract

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI(DERWENT), CNPAT(CN), PAJ(JP)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP. A. 57039753(SAKAI Y) 05.MAR. 1982 (05. 03. 82)	1-10
A	JP. A. 3251518(ICHIMARU FARUKOSU K) 11. .NOV. 1991 (11.11.91)	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

Special categories of cited documents:	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"T" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"I" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	

Date of the actual completion of the international search  
30. JUN. 2003 (30.06.03)

Date of mailing of the international search report

07 AUG 2003 (07. 08. 03)

Name and mailing address of the ISA/CN  
6 Nincheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,  
100088 Beijing, China  
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

Telephone No. 86-10-62093102



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN 03/00309

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family Member(s)	Publication date
JP 57039753A	05--03--1982	JP61041543B JP1376400C	16--09--86 22--04--87
JP 3251518 A	11--11--1991	None	

## A. 主题的分类

PCT(7):A61K35/78, A61P9/00, 25/28, 35/00,

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

PCT(7):A61K35/78, A61P9/00, 25/28, 35/00,

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国专利数据库 中国药学文摘

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI(DERWENT), CNPAT(CN), PAJ(JP)

## C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	JP, A, 57039753(SAKAI Y) 1982 年 3 月 5 日 (05. 03. 82)	1-10
A	JP, A, 3251518(ICHIMARU FARUKOSU K)1991 年 11 月 11 日 (11.11.91)	1-10

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

## 引用文件的专用类型:

- "V" 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件
- "I" 在专利申请日当天或之后公布的在先的申请或专利
- "T" 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件
- "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
- "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

- "T" 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理
- "X" 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是具有创造性
- "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性
- "&" 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

30.6 月 2003 (30.06.03)

国际检索报告邮寄日期

07.08.2003 (07.08.03)

国际检索单位名称和邮寄地址

ISA/CN

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

受权官员

电话号码: 86-10-62093102

实际检索报告  
关于同族专利成员的情报

申请号  
PCT/CN03/00309

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
	05--03--1982	JP61041543B	16-09-1986
		JP1376400C	22-04-1987
JP 3251518A	11--11--1991	无	